

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

о диссертации Добряковой Ксении Сергеевны «МОЛЕКУЛЯРНО-ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВИДОВ *ELYMUS* L. ФЛОРЫ

РОССИИ», представленной на соискание ученой степени

кандидата биологических наук по специальностям

03.02.07 – «Генетика» и 03.02.01 – «Ботаника».

Актуальность избранной темы. Проблема классификации живых организмов, исторически восходящая к античным временам, не утрачивает актуальности и в настоящем, в частности, по причине постоянного пополнения научных знаний новыми данными о самых различных объектах. Современная биологическая систематика, применимая для классификации всех живых организмов, основывается на эволюционных связях между таксонами, которые выявляются путём сопоставления сходства и различия объектов по определенным признакам, как морфологическим, так и молекулярным. Развитие и внедрение в практику современных методов молекулярной генетики открывает широкие возможности для анализа филогенетических отношений между группами объектов любых таксономических категорий. Постоянно прогрессирующее накопление данных об отдельных диагностических фрагментах, а в перспективе, и о целых геномах, позволяет выводить филогенетические исследования на принципиально новый уровень, приближаясь к построению системы, в максимальной степени отражающей эволюционное сходство и различие таксонов, а также (что немаловажно) обоснованно разграничивающей таксоны между собой.

Молекулярная филогения, основанная на анализе последовательностей ДНК, относительно недавно стала общепринятым подходом, используемым в классификации растений. Действительно, представители царства Растения, из-за своей способности к межвидовому скрещиванию, полиплоидизации и горизонтальному переносу генов (маскирующих эволюционные сигналы), являются непростыми объектами для биологической систематики и эволюционной биологии. По этой причине рассматриваемая диссертационная работа Добряковой К.С., посвященная изучению молекулярной филогении рода *Elymus* (Пырейник), одного из самых трудных в таксономическом отношении родов семейства Злаки (Poaceae), несомненно, представляется актуальной и значимой.

Научная новизна и практическая значимость работы. В работе Добряковой К.С. был проведён анализ родственных связей между видами *Elymus* L. sensu lato флоры России с помощью методов молекулярной филогении, основанных на секвенировании диагностических фрагментов ядерных (ITS1-5.8S-ITS2) и хлоропластных (*trnL-trnF*) генов. В результате впервые были выявлены два семейства риботипов (типов ITS / типов рДНК) у видов *Elymus* Евразии, названных Northern St-rDNA и Southern St-rDNA. Также выявлены не менее 6 разных вариантов гаплотипов хлоропластной ДНК, не согласующихся с идентифицированными риботипами. Основным результатом работы, с точки зрения официального оппонента, представляется заключение о необходимости пересмотра системы видов в роде *Elymus*, созданной чл.-корр. РАН Н.Н. Цвелёвым и являющейся общепринятой среди российских ботаников (хотя в тексте диссертационной работы это и не утверждается прямо). Это заключение также хорошо согласуется с результатами анализа молекулярной филогении американских и китайских видов *Elymus*, выполненного зарубежными исследователями.

Вопросы и замечания. У официального оппонента возник ряд вопросов и замечаний, на которые необходимо получить ответ: 1) Позволило ли проведенное исследование принципиально обогатить мировое знание о структуре рода *Elymus*, или полученные результаты полностью согласуются с ранее полученными результатами других авторов? 2) Согласны ли Вы с классификацией видов рода *Elymus*, предложенной С. Yen с соавторами (2005) и основанной на геномной конституции? Если нет, то почему, а если да, то для чего Вы придерживаетесь классификации по Н.Н. Цвелёву? 3) Как Вы полагаете, возможно ли по гербарному материалу оценивать плоидность образца и наличие St, H, Y и иных геномов, и если да, то на основе каких методов и подходов? 4) Сколько лет пырейник может размножаться вегетативно и вообще существовать? Т.е. какой процент популяции может быть представлен стерильными особями, продуктами различных «неудачных» скрещиваний? 5) В чём смысл анализа только парсимонично значимых сайтов, а не полных последовательностей? 6) На каком основании Вы строили сеть NeighbourNet для последовательностей хлоропластных генов (приложение 4), хотя в тексте диссертации указано, что Вы исходите из предположения о материнском наследовании хлоропластной ДНК (стр. 98)? Ведь рекомбинации в хлоропластной ДНК при этом ожидать нельзя, раз наследование вертикальное? 7) Для сколько образцов известны последовательности как ядерного (ITS), так и хлоропластного (*trnL-trnF*), фрагментов? Если сопоставить топологии кладограмм на их основе, насколько они будут сходными / различными? И как это объяснить?

Есть и иные замечания, касающиеся использованных методов и сделанных выводов. Для выделения ДНК из гербарного материала существуют коммерческие наборы, позволяющие существенно повысить успешность ПЦР при анализе по сравнению с традиционными методами. Соотношение частот транзиций и трансверсий и не должно равняться 0,5 (т.е. такая «нулевая гипотеза» необоснованна), поскольку мутационный процесс оперирует не «буквами» А, Т, Г и Ц, а реальными молекулами, различающимися по биохимическим и стехиометрическим свойствам, кроме того, эмпирические данные показывают, что транзиции встречаются чаще, чем трансверсии. Следовательно, никакой особой роли естественного отбора, действовавшего на эти последовательности, проследить таким образом нельзя (использование подходов молекулярной эволюции, таких как расчёт критерия Таджимы и более сложных критериев, в свою очередь, может позволить наблюдать отклонение от модели нейтральной эволюции). Схемы вторичной структуры ITS1 и ITS2 (рис. 13 и 14) изображают кольцевую РНК, что не соответствует общепринятой модели вырезания ITS из предшественника рибосомной РНК. Неясна формулировка на стр. 95 «...мы столкнулись с низкой изменчивостью последовательностей ITS и *trnL-trnF*, что привело к получению недостаточно разрешенных топологий, а с другой стороны, с большим числом случайных нуклеотидных замен участков ITS1 и ITS2, не меняющих вторичную структуру пре-РНК, но маскирующих филогенетический сигнал и затрудняющий построение хорошо разрешенных кладограмм». Случайные нуклеотидные замены как раз и являются тем самым «сигналом», который раскрывает эволюционную историю образца, если только не представляют собой артефакты секвенирования. Вывод о «неслучайности» распределения мутаций в ITS-последовательностях (вывод 1) не соответствует действительности (подсчёты показывают, что на самом деле распределение не отличается от случайного). Наконец, вывод 8 не является выводом из проделанной работы, а, скорее, суммирует некоторые её результаты.

Оценка достоверности и новизны исследования, полученных результатов и выводов. В целом, диссертационное исследование представляет собой работу на очень сложном материале, к тому же не полученном автором непосредственно (а работа с чужим материалом всегда опасна и трудна). К достоинствам работы следует отнести адекватное применение методов построения сети NeighborNet для анализа родственных отношений между видами, эволюционная история которых, вероятно, включала события гибридизации и/или полиплоидизации. Несомненным

достоинством работы также является подход к выявлению (и исключению из анализа) псевдогенов 5.8S-рДНК на основе их GC-состава.

Работа выявила ряд проблем, связанных с систематикой и таксономией видов злаков, описываемых по коллекционным образцам. Так, представляется, что удобные с точки зрения каталогизации названия видов в реальности описывают не виды в «линнеевском», или «вавилонском», смысле (т.е. относительно крупные таксономические единицы), а некоторые группы растений, несущие характерные фенотипические отличия. Данные отличия, однако (как видно из молекулярно-генетического анализа), не имеют большого веса для биологической систематики по той причине, что, в полном соответствии с законом гомологических рядов Н.И. Вавилова, могут появляться и исчезать независимо в разных группах растений, объединённых общим происхождением. Полнота использованной коллекции гербарных образцов (т.е. репрезентативность выборки, в идеале описывающей всё разнообразие форм евроазиатских пырейников) тоже неочевидна (поскольку существует очень много вариантов). Однако экспертную оценку достоинствам работы и значимости результатов для ботанической науки должны давать специалисты в данной области.

С позиций же современной генетики представляется несомненным, что диссертационная работа Добряковой К.С. выполнена на достаточно высоком уровне, носит законченный характер и является целостным исследованием, включающим подходы молекулярной генетики и геносистематики для характеристики родственных отношений видов *Elymus* L. sensu lato флоры России. Однако, следует заметить, что в эпоху «больших данных» целесообразно было бы вовлечь в анализ все доступные последовательности диагностических фрагментов родственных видов и образцов, представленные на NCBI (там находится не менее 500 последовательностей ITS с высоким сходством (из них более 100 шт. с >90%-ным сходством) с последовательностями *Elymus*). С другой стороны, возможно, это сделало бы общую картину ещё более запутанной... Полученные в работе данные имеют определённое значение для построения филогении рода *Elymus* в мировом объёме, поэтому их опубликование в международном журнале, безусловно, было бы нелишним для мирового научного сообщества (несмотря на относительно скромный вклад диссертанта в развитие понимания эволюции геномов злаков).

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, трёх глав, заключения, выводов и трёх приложений. Материал изложен литературным языком, что облегчает понимание сложных проблем, поднимаемых

диссертантом. Полный объём диссертации составляет 174 страницы, включая приложения на 28 страницах, с 22 рисунками и 24 таблицами. Список литературы содержит 208 наименований.

Соответствие диссертационной работы критериям "Положения о присуждении ученых степеней". Диссертационная работа К.С. Добряковой «Молекулярно-филогенетическое исследование видов *Elymus* L. флоры России» соответствует критериям, установленным в «Положении о присуждении учёных степеней», утверждённом Правительством РФ от 24 сентября 2013 года № 842), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а её автор Добрякова К.С. заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.07 – «Генетика» и 03.02.01 – «Ботаника».

Жуков Владимир Александрович

кандидат биологических наук, без звания

ведущий научный сотрудник, и.о. заведующего лабораторией генетики растительно-микробных взаимодействий Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии» (ФГБНУ ВНИИСХМ)

Санкт-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского, 3. 196608.

тел. +7 (812) 470-51-83

адрес электронной почты: VZhukov@ARRIAM.ru,
vladimir.zhukoff@gmail.com

Подпись ведущего научного сотрудника, и.о. заведующего лабораторией генетики растительно-микробных взаимодействий ФГБНУ ВНИИСХМ Жукова Владимира Александровича удостоверяю.

Начальник отдела кадров
ФГБНУ ВНИИСХМ



Ковалевская М.А.

28.05.2018г.